

学校编码: 10384
学号: 20120051302102

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

H5 亚型禽流感病毒广谱治疗性单抗 13D4 中试工艺的
建立, 及其晶体培养与表位预测

**Purification, Crystalization of broad spectrum Anti-H5 AIV
Therapeutic Mab 13D4 and Prediction of its Epitope**

魏 旻 希

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

目 录	I
摘 要	—
缩 略 语	i
第一章 前言	1
一. 禽流感病毒	2
1.1 禽流感病毒的形态特征及其化学组成	2
1.2 禽流感病毒基因组和主要蛋白的功能	3
1.3 HA 蛋白的结构和功能	4
1.4 禽流感病毒的流行与危害	6
1.5 禽流感的防治	8
二. 治疗性单克隆抗体	9
2.1 治疗性单克隆抗体的历史	9
2.2 单克隆抗体的结构和作用机理	9
2.3 单克隆抗体的分类	10
2.4 H5 亚型禽流感病毒的广谱治疗性抗体	10
三. 蛋白质结晶学	11
3.1 蛋白质晶体学发展历史	11
3.2 蛋白质的结晶原理和方法	12
3.3 影响蛋白质晶体生长的因素	13
3.4 蛋白质结晶条件的筛选和优化	18
四. 蛋白质结构预测	19
4.1 蛋白结构预测方法的迫切需要及其诞生	19
4.2 理论计算方法在蛋白质空间结构建模中的应用	19
4.3 基于蛋白质结构认识的结构预测	21
4.4 蛋白结构预测在抗体模拟上的应用	23
五. 本论文的研究目的, 思路及意义	25
5.1. 研究的目的和思路	25
5.2. 研究的意义	25
第二章 材料与方 法	26
一. 仪 器	26
二. 材 料	27

2.1 腹水与单抗.....	27
2.2 基因序列及其蛋白晶体结构.....	27
2.3 其他试剂.....	28
2.4 常用溶液配制.....	28
三. 方法.....	29
3.1 利用切向流装置改变缓冲液体系.....	29
3.2 饱和硫酸铵沉淀.....	29
3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)	29
3.4 AKTA 色谱纯化.....	30
3.5 抗体 Fab 片段制备及纯化.....	31
3.6 分子筛层析分析	31
3.7 毛细管电泳分析.....	31
3.8 抗体原液的检定规程.....	31
3.9 蛋白质晶体培养.....	36
3.10 抗体模拟.....	39
3.11 模型合理性验证	41
3.12 抗体和 HA 抗原的分子对接.....	42
3.13 复合物溶剂可及表面分析和表位确定.....	42
3.14 与 HA 抗原保守表位区域结合的抗体多肽.....	42
第三章 结果与分析.....	43
第一部分 13D4 全抗体的纯化工艺的建立及其 F(ab)₂ 片段制备与纯化的摸索	43
一. 13D4 全抗体的纯化工艺的建立.....	43
1.1 13D4 单抗初级分离纯化条件的摸索.....	44
1.2 13D4 单抗精制分离纯化条件的摸索.....	45
1.3 13D4 单抗原液检定小结	60
二. 13D4 单抗 F(ab)₂ 片段制备与纯化.....	64
2.1 13D4 单抗 F(ab) ₂ 片段制备.....	64
2.2 13D4 单抗 F(ab) ₂ 片段纯化.....	67
三. 第一部分小结.....	69
第二部分 13D4 单抗 Fab 片段的结晶.....	70
一. 样品的准备.....	70
二. 13D4 单抗 Fab 片段的结晶条件的初筛.....	70
三. 13D4 抗体 Fab 片段的结晶条件的优化.....	71

3.1.基于 30%(w/v) PEG 1500 条件的优化.....	71
3.2 基于 20%(w/v) PEG 3350,0.2 mol/L KAc 条件的优化.....	74
3.3 对最优条件的油滴法优化.....	79
3.4 晶体大小的测量与验证.....	79
四.第二部分小结	81
第三部分 抗体 13D4 Fab 片段结构模拟及其结合位点预测	82
一. 抗体 13D4 Fab 以及 YU22 HA1 的同源模建:	82
1.1 模板的选取	82
1.2 13D4 Fab 以及 YU22 HA1 的分子模建.....	84
二. 结构评测	86
2.1.能量分析	86
2.2.SAS 值分析	86
2.3.氢键分析	86
2.4.二面角分析	88
2.5.Profiles-3D 分析.....	89
三. 分子对接及其表位分析	90
3.1 抗体 13D4Fab 和 HA 抗原分子对接模式.....	90
3.2.HA 蛋白抗体 13D4Fab 表位的分析.....	90
四. 抗 H5 禽流感病毒药物的初步探索	93
4.1.抗 H5 禽流感多肽药物设计的基础.....	93
4.2.抗体 13D4Fab 中与 HA 中和表位区域结合的多肽.....	94
五. 第三部分小结:	95
第四章 讨论	96
第五章 小结与展望	102
一. 小结	104
二. 展望	104
参考文献.....	105
致谢.....	112
硕士期间发表文章.....	113

摘要

高致病性禽流感 (Avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒 H5N1 引起的烈性传染病。近年来, 该疾病随着候鸟迁徙不断向各国传播, 在造成巨大的经济损失的同时, 也引起了多例人感染禽流感的病例, 因此, 对禽流感防治手段的研究引起了广泛重视。中和单抗是防治病毒性疾病的一种很有效手段。但是由于禽流感病毒基因突变频率高, 尤其以血凝素 (HA) 基因为最, 因此针对禽流感病毒的中和单抗中和谱较窄, 往往只能中和少数遗传变异亚系的病毒, 这就极大限制了这些中和单抗的应用。

本实验室所制备的单抗 13D4 具有广谱中和活性, 能有效中和 41 株不同遗传变异亚系的 H5N1 病毒代表株, 在禽流感的防治中具有广阔的应用前景。本研究通过实验摸索, 建立了一套低成本, 简便高效的 13D4 全抗体和 F(ab)₂ 的纯化制备方法, 在中试规模生产中能够制备出符合国家检定标准的产品, 纯度达到 99% 左右, 得率为 60%, 为该抗体药物的成功奠定了基础。

为了进一步揭示 13D4 广谱中和活性的机制, 本研究还进行了 13D4 Fab 片段晶体的培养。通过对 13D4 Fab 片段培养条件的筛选和优化, 制备出了能用于 X 射线晶体衍射的单晶。

另外, 本研究还通过分子模拟的方法, 得到了抗体 13D4 Fab 片段以及 A/Ck/HK/Yu22/02 (H5N1) HA1 的三维结构, 并通过 Fab 分子依次与已有晶体结构的 3 个 H5 亚型 HA 以及模拟的 HA1 分子进行对接, 预测单抗 13D4 可能结合表位为: 由 13 个 Glu¹¹², Lys¹¹³, Ile¹¹⁴, Pro¹¹⁸, Ser¹²⁰, Ser¹²¹, Ser¹²³, Lys¹⁶¹, Arg¹⁶², Ser¹⁶³, Tyr¹⁶⁴, Asn¹⁶⁸, Lys²⁵⁵ 不连续氨基酸残基组成的构象表位。还利用分子对接结果分析 H5 亚型禽流感的广谱中和表位和, 综合单个 Fab 分子与 4 个 HA 分子的对接结果用于寻找该单抗识别的 HA 抗原表位, 用于寻找与抗原良好契合的多肽结构。13D4 Fab 片段上可能用于治疗禽流感的多肽片段为 Gln²⁷-Thr²⁸-Ser³⁰-Gly³¹-Leu⁵²-Gly⁵⁴-Ser⁵⁵-Asn⁵⁷-Thr¹⁰⁰-Thr¹⁰¹-Ala¹⁰²-Val¹⁰³。

关键词: H5 亚型流感病毒血凝素; 单克隆抗体; 抗原表位; 结晶; 分子模拟。

Abstract

Highly pathogenic avian influenza (AI), one of syndrome disease caused by influenza A virus H5N1, has recently spread to many countries by the migratory birds. It severely led heavy loss of national economy in these countries, and even caused fatal disease on human. Study on prevention and treatment of avian influenza has aroused extensive attention. Neutralization antibody becomes one of effective means to contral virus disease. Because avian influenza virus mutants frequently, especially in the hemagglutinin gene, most H5N1 mab only neutralize narrow spectrum of virus.

Our research group has indentified a strain of broad spectrum neutralization antibody, named 13D4, which binds to 41 representative strains of H5N1 virus from various clades. In this study ,a easilyscaled -up and high-effective process with low cost was established to purify 13D4 and F(ab)₂ fragments. The purity of final product was about 99% and the recoverity rate is about 60%. All the test ruesults fulfiled the requirements of PHARMACOPOEIA of PRC.

In this study, the vapor diffusion technique was used to crystallize 13D4 Fab fragment, and sigle crystals suitable for X-ray diffraction were obtained in some conditions after screening and Optimization.

The structures of 13D4 Fab fragment and HA1 from A/Ck/HK/Yu22/02 (H5N1) were modeled by homology modeling. Then 13D4 Fab was subject to dock with three HA structures found in PDB (PDB ID: 1jsm, 2ibx and 2fk0) and HA1 from A/Ck/HK/Yu22/02 (H5N1) . The binding patterns between the antibody and the HA were analyzed according to the docking results. The binding pattern of 13D4 Fab with the 4 HAs was used to search the broad neutral epitopes which the antibody binding to and the interacting polypeptides located in the antibody which may be made use of the reference of the anti-virus drug. The polypeptide located in 13D4 Fab fragment is Gln²⁷-Thr²⁸-Ser³⁰-Gly³¹-Leu⁵²- Gly⁵⁴-Ser⁵⁵-Asn⁵⁷-Thr¹⁰⁰-Thr¹⁰¹-Ala¹⁰²-Val¹⁰³.

Key words: H5HA; monoclonal antibody; antigen epitope; crystallization. molecular modeling.

ABBREVIATION (缩略词)

aa: amino acid, 氨基酸

AD: Antigenic determinant, 抗原决定簇

AI: Avian Influenza, 禽流感

AIV: Avian Influenza Virus, 禽流感病毒

CDR: Complementarity Determining Region, 抗原决定簇

CH: Constant Region of Heavy Chain, 重链恒定区

CL: Constant Region of Light Chain, 轻链恒定区

Da: Dalton, 道尔顿

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定

HA: Hemagglutinin, 血凝素

HI: Haemagglutination Inhibition Test, 血凝抑制实验

HPAIV: high pathogenic avian influenza virus, 高致病性禽流感病毒

IFA: Indirect immunofluorescent assay, 间接免疫荧光检测

kD: kilo Daltons, 千道尔顿

mAb: monoclonal antibody 单克隆抗体

MAP: Multiple antigen peptide, 多抗原肽

MW: Molecular Weight, 分子量

NA: Neurominidase, 神经氨酸酶

NLS: Nuclear Location Signal, 核定位信号

NP: Nucleocapsid, 核壳蛋白

NS: Nonstructural, 非结构蛋白

ORF: Open Reading Frame, 开放读码框架

SAS: Solvent Accessible Surface, 溶剂可及化表面积

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

VH: Variable Region of Heavy Chain, 重链可变区

VL: Variable Region of Light Chain, 轻链可变区

vRNA: Virus RNA, 病毒RNA

第一章 前言

自1997年我国香港特别行政区发生高致病性禽流感(H5N1)爆发流行以来,我国大陆及越南、印度尼西亚等东南亚周边国家以及欧洲(土耳其等国)、中东(伊拉克)、非洲(埃及等国)相继报道了人感染高致病性禽流感(H5N1)病例^[1,2]。自2003年至2008-06-19,世界卫生组织报告人感染高致病性禽流感A (H5N1)确诊病例达385例(14个国家),病死率高达63%^[1]。尽管目前没有确切证据表明禽流感能在人-人之间传播,但由于禽流感病毒可能通过候鸟迁徙造成全球播散,人类对禽流感病毒普遍缺乏免疫力,H5N1禽流感高病死率以及可能出现的病毒变异等原因,使H5N1禽流感作为可能引起国际大流行、严重威胁公共卫生安全的烈性传染病,受到世界范围的密切关注^[1-5]。在禽流感病毒的研究中发现,高致病性病毒表型与多个基因相关,但在禽中主要是血凝素(HA)基因,因此HA蛋白成为防治禽流感病毒的主要靶蛋白。

在治疗禽流感的药物中,治疗性抗体作为靶向型药物,具有特异性强,疗效好等优点。因此,以HA蛋白为靶向的治疗性抗体的生产和研究,对于禽流感的治疗,以及HA蛋白的结构和功能研究,都有着重大意义。

抗体作为一种蛋白质,其三维结构、运动及相互作用决定了它们的功能。对抗体结构的解析可以进一步研究其结合位点及作用方式,揭示与其结合的抗原表位及它的作用方式。在解析结构的方法中,X射线晶体衍射法是目前最精确的方法之一,该方法首先需要得到高质量的蛋白质晶体。由于蛋白质的分子量大,分子空间构象复杂,静电特性、物理化学性质的不稳定性,使蛋白质的晶体培养工作相当困难。目前蛋白质等生物大分子的晶体培养仍然是摸索性和经验性的,在某种程度上还要靠机遇。晶体培养已成为当前阻碍晶体结构分析速度提高的关键性问题。

此外,近年来发展起来的蛋白质结构模拟技术是生物技术与计算机技术的有效结合,为解决蛋白结构和功能以及蛋白质工程实施方面所面临的难题提供了另外一种可选方法。抗体结构模拟技术是蛋白结构模拟技术之一,通过已知的抗体序列,可以模拟这个抗体的空间模型,从而为研究抗原抗体相互作用性质提供了依据。这种方法已经广泛应用于提高抗体亲和力,抗体的人源化及其抗原表位的分析。

一. 禽流感病毒

1.1 禽流感病毒的形态特征及其化学组成

禽流感病毒属于正粘病毒科A型流感病毒。病毒为直径80-120nm的球形颗粒，但刚分离到的病毒多为丝状体^[6,7]。病毒颗粒结构从外到内可分为3层:最外层为双层类脂囊膜，囊膜由纤突，双层类脂膜构成，纤突在囊膜表面呈放射状排列的突起，长度约12-14 nm，这种表面纤突有两类：一类是呈棒状，由HA分子的三聚体构成；另一种是呈蘑菇状，由NA分子的四聚体构成，两种纤突在囊膜上的比例为4-5:1，囊膜中还镶嵌着基质蛋白M2。中间的基质膜紧贴在类脂双层内面，由病毒粒子内的基质蛋白M1组成。最内层是直径9-15nm的螺旋对称的核壳体，由核酸、NP及三种聚合酶(PB1、PB2、PA)所组成。核壳体内含8个节段的病毒基因组，均为单股、负链RNA。

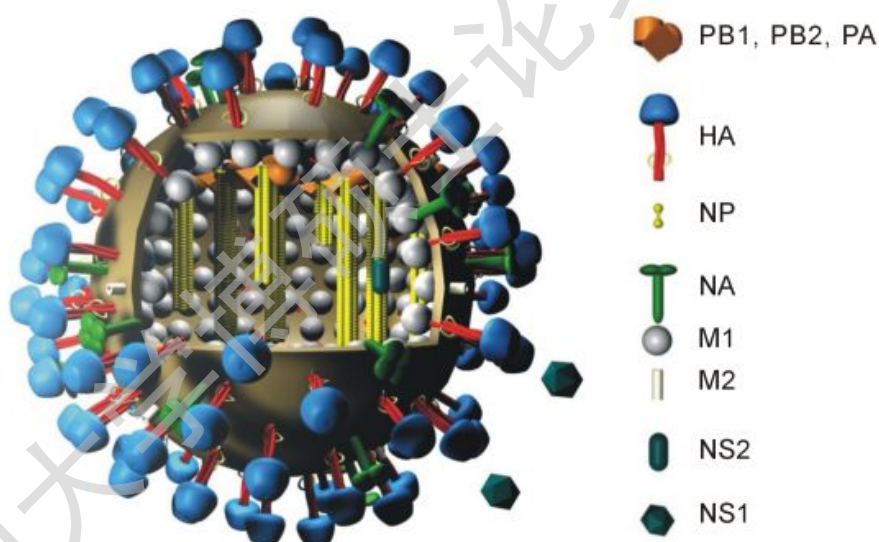


图 1-1 流感病毒的结构

Fig. 1-1 The structure of influenza virus

(摘自Thomas, J.K.; Noppenberger, J., Avian influenza: a review, Clinical review, 2007, 64 (2):149-165)

禽流感病毒粒子大约由0.8%-1.1%的RNA，70%-75%的蛋白质，20%-24%的脂质和5%-8%的碳水化合物组成。脂质位于病毒的膜内，大部分为磷脂，还含有少量的胆固醇和糖脂。几种碳水化合物包括核糖(在RNA中)、半乳糖、甘露糖、墨角藻糖和氨基葡糖，在病毒粒子中主要以糖蛋白或糖脂的形式存在。病毒蛋白及潜在的糖基化位点是病毒基因组特异的，但病毒膜的糖蛋白或糖类链的脂质和碳水化合物链的成分，是由宿主细胞确定的。HA切割位点附近寡糖侧链也能影

响蛋白水解酶对HA的切割性。

1.2 禽流感病毒基因组和主要蛋白的功能

禽流感病毒的基因组由8条单股负链RNA组成，分为8个基因片段，编码10种蛋白，各片段长短不一，分别以片段1、2、...、8来命名，依次编码病毒的聚合酶复合体中PB1、PB2、PA、血凝素(HA)、病毒核衣壳蛋白(NP)、神经氨酸酶(NA)、基质蛋白(M1, M2)和非结构蛋白(NS1, NS2)。其中片段1和片段2最大，约2340bp，片段8最小，约890bp。除了片段4和6外，不同毒株的基因物理图谱都相同^[8]。

HA、NA和M1蛋白参与组成病毒的囊膜；M2蛋白构成病毒囊膜的质子通道；NP蛋白与基因组RNA结合构成核酸核蛋白体，然后与PB1、PB2和PA共同组成病毒的核心部分，基质蛋白M1位于病毒粒子的囊膜内侧，包裹病毒的核心部分；M1和NP蛋白共同构成A型流感病毒的型特异性抗原。上述8种蛋白与病毒基因组共同组成流感病毒粒子。而流感病毒中最小的RNA片段所编码的NS1和NS2蛋白位于病毒感染的宿主细胞的胞质中。最近，有研究表明NS2也部分参与组成病毒的结构^[9]。流感病毒蛋白的主要性质见表1-1

表 1-1 流感病毒蛋白的功能

Fig.1-1 The function of Influenza A virus proteins

RNA	编码蛋白	已知功能
4	HA	结合受体；融合细胞膜和病毒以感染细胞
6	NA	切除细胞的神经氨酸防止病毒聚合；
7	M1	影响基因组以及核传输；协助病毒颗粒组装
	M2	组成四聚体作为离子通道；为 HA 在高尔基体中合成以及病毒去壳提供低 pH 值环境
5	NP	核蛋白(衣壳)并且病毒合成 转录酶复合物
1	PB-2	基因帽端结构组成部份，转录酶，毒力决定因素
2	PB-1	RNA 接触反应聚合酶的组成部分
3	PA	病毒 RNA 聚合酶的组成部分
8	NS(non-structural)	
	NS1	转录后 RNA 控制；抑制干扰素
	NEP	病毒 RNA 从核内输出；病毒的组装

1.3 HA蛋白的结构和功能

1.3.1 HA蛋白的结构

HA蛋白编码基因是禽流感基因组中最易发生变异的一个基因片段，不同毒株的HA基因序列均存在一定差异，并以此将禽流感分为16个HA亚型(H1-H16)。目前对大多数亚型的HA基因已经克隆测序，发现完整开放阅读框(ORF)长度为1742-1778 bp，在5'端和3'端分别有20和35个核苷酸组成的非编码区，编码区由1683-1698个核苷酸组成，编码560-566个氨基酸^[7]，氨基酸序列分析显示H1和H3亚型的HA蛋白差别最大，同源性仅为25%；H2和H5亚型HA蛋白的同源性最高，可为80%；同一亚型不同毒株之间HA蛋白的同源性均在90%以上。HA为流感病毒囊膜纤突的主要成分之一，为杆球形蛋白分子。其分子量为75kD，属于I型糖蛋白。自然状态下HA以三聚体形式存在于双层类脂层上，其顶端为膨大的球形体，由不平行的 β 折叠片构成，含有受体结合位点和抗原表位；多数糖链位于球形体下面的基部，使茎部外侧面有亲水性^[10]；柄状区域包含有3股 α -螺旋线圈，与囊膜相连并伸出膜外7.6 nm。HA前体产生后通常在加工过程中先切除信号肽，然后由细胞中的蛋白酶裂解成HA1和HA2，靠近前导序列N端的328个氨基酸为HA1，C端221个氨基酸为HA2，分子量分别为36KD和27KD，两者通过HA1的14位上和HA2的13位上的半胱氨酸之间形成一条二硫键以及其它共价键相互连接。每3个HA1和HA2又以二硫键结合成为功能性三聚体或HA1加HA2二聚体。HA含7个寡糖链，6个在HA1，位置分别是8，22，38，81，165，285，1个在HA2，位于154。HA单体由2部分组成，一部分为球状的头部，含有受体结合位点和抗原决定簇；另一部分为柄，与囊膜相连。A型流感病毒的细胞受体是位于细胞膜上的唾液酸酶或唾液酸蛋白。HA头部的受体位点呈袋状，位于头部末端，每个单体具有1个受体位点，因此每个纤突上有3个受体结合位点，构成这一袋状位点的氨基酸均为高度保守氨基酸。

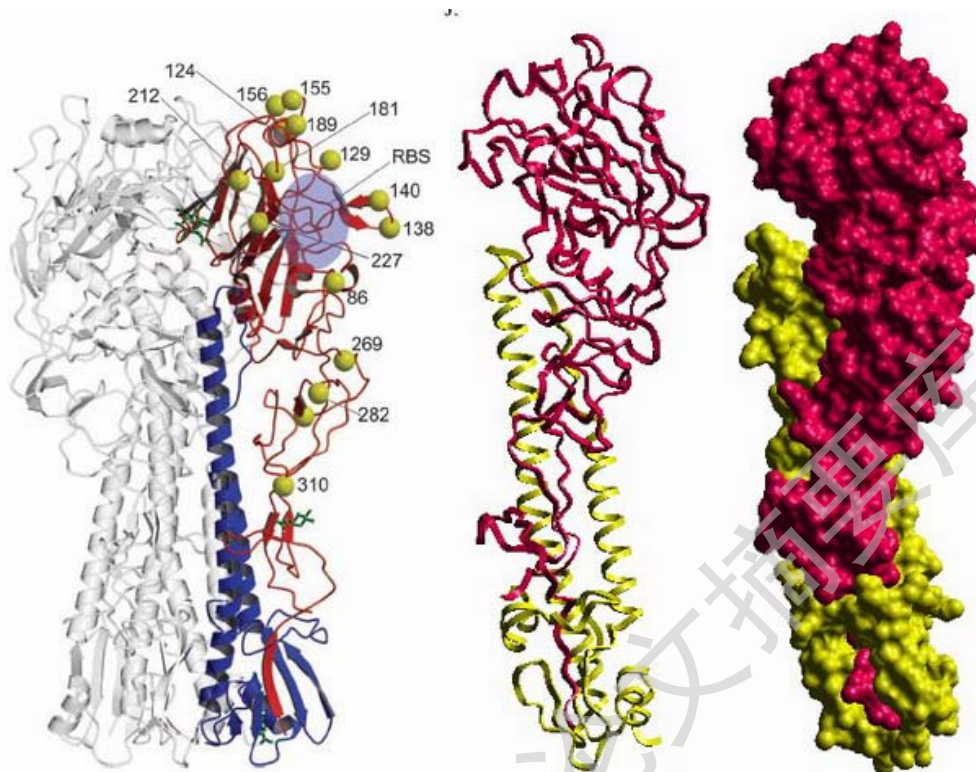


图1-2 流感HA蛋白(HA)的三维晶体结构

Fig.1-2 The crystal structure of the HA

(摘自Wai Lan Wu, Yixin Chen, Pui Wang, et al. Antigenic Profile of Avian H5N1 Viruses in Asia from 2002 to 2007, JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 2008, 82(4):1798-1807)

1.3.2 HA蛋白的生物学功能

1.3.2.1 介导病毒的吸附和穿膜

HA蛋白在病毒吸附和穿膜过程中起关键作用。HA纤突是由3个HA单体聚合形成的三聚体,其顶端膨大的球形体内含有靶细胞膜上唾液酸糖脂或唾液酸糖蛋白受体结合位点RBS。组成RBS的氨基酸很保守,并且这些氨基酸侧链按一定的规则排列,使之能与靶细胞受体直接接触。HA蛋白吸附于靶细胞膜后,被蛋白酶水解为HA1和HA2两条多肽链是病毒造成感染的先决条件。HA1链具有与宿主细胞受体特异性结合的特性,HA2链N端含有融合序列(N-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-Gly-),是参与细胞膜融合的重要亚单位。即禽流感通过其血凝素球部中的RBS与靶细胞膜上相应受体结合后,HA结构重排,带有融合序列的HA2链暴露出来并与细胞质膜发生融合,病毒基因组穿入细胞内,病毒复制开始^[11]。

1.3.2.2 免疫保护作用

HA蛋白也是禽流感病毒中最重要的保护性抗原。它不仅可刺激机体产生保护性抗体,而且可诱导产生细胞毒作用,对同一亚型病毒的攻击产生良好的保护力。AlanR等人分别以重组HA1、HA2蛋白免疫大白鼠,用ELISA实验检测免疫鼠的抗血清,结果表明HA1和HA2重组蛋白均能够刺激机体产生中和抗体,HA1蛋白的分子表面至少存在4个抗原表位,其免疫原性优于HA2蛋白。此外,用纯化的HA蛋白免疫小鼠制备的单克隆抗体大部分是针对HA1蛋白的。因而,HA1蛋白和HA1单克隆抗体已被作为检测禽流感感染的诊断抗原和抗体,HA蛋白或HA1蛋白是研制基因工程亚单位苗的理想候选抗原^[12]。

1.3.2.3 影响病毒的毒力

禽流感毒力是各基因产物共同作用的结果,但HA蛋白在其中起着最为重要的作用。HA蛋白能否被水解为HA1和HA2是禽流感感染细胞的先决条件,而裂解位点的氨基酸序列决定着病毒毒力。通过对多株禽流感病毒HA核苷酸序列和氨基酸序列的比较分析,发现高致病性禽流感病毒裂解位点有6个连续碱性氨基酸,而低致病性禽流感病毒仅有2个碱性氨基酸^[12]。

1.4 禽流感病毒的流行与危害

1.4.1 禽流感的宿主范围和传播

A型禽流感病毒在自然条件下可以感染多种野鸟和家禽,尤其水栖鸟类。目前分离到的世界上带病毒鸟类至少90种,我国已在17种野鸟中发现禽流感病毒。禽流感病毒可以通过感染禽与易感禽之间的直接接触传播或间接接触传播。目前认为主要是接触传播,即通过直接接触受H5N1病毒感染的家禽及其粪便而感染。常见经飞沫和水源即“粪—水—口”途径传播,禽流感的水平传播虽然很普遍,但很少发生垂直传播。不过,禽流感感染母鸡后可以从产出的鸡蛋的蛋壳上和内容物中检测到病毒。在实验研究中发现,用宾夕法尼亚州分离的H5N2病毒接种母鸡后第3-4天产下的大部分鸡蛋带有病毒^[13]。但是,由于禽流感可以致鸡胚死亡,因此难以发生垂直传播。

1.4.2 禽流感的危害

1994年,美国动物卫生协会家禽和其它禽类可传播疾病委员会将禽流感划分为高致病性、温和致病性、无致病性三种,但是习惯上还是将后两者统称为低致

病性禽流感。在所有的亚型组合中,目前只发现部分H5、H7亚型属于高致病性禽流感,其它亚型皆表现为低致病性^[14]。

高致病性禽流感的每次爆发都给养禽业造成巨大的经济损失。美国宾夕法尼亚州1924-1925年和1929爆发的高致病性禽流感,家禽的死亡率接近100%。1983年10月美国宾夕法尼亚州再次爆发H5N2亚型高致病力禽流感,随后疫情扩大到新泽西州、马里兰州和弗吉尼亚州,总损失达6000多万美元^[7]。

尽管如此,一直以来人们普遍认为高致病性禽流感的发生比较罕见,因为在1959-1998年的40年间,世界范围内一共只报道了8次高致病性禽流感^[15]。然而自1999年始,高致病性禽流感的爆发变的非常频繁,在1997-2004的七年里就发生了8次高致病性禽流感,而且涉及的范围更加广泛,尤其是2004禽流感的爆发最为严重,此次禽流感流行的规模之大、地理分布范围之广、破坏程度之深在人类养禽业历史上均是史无前例的。据不完全统计,亚洲各国死亡或淘汰的禽只总数近1亿只,超过历史各次高致病力禽流感感染/淘汰禽数的总量。在我国,2004年初由H5N1亚型AI病毒引起的高致病力禽流感流行的有16个省/直辖市,确诊49起,历时近2个月,给畜牧业造成了严重的经济损失,同时也影响了我国旅游业、对外出口和整个国民经济的发展^[17]。2005-2008年H5N1亚型禽流感更是卷土重来,涉及范围包括亚、欧、非洲的三十多个国家和地区,并用几近疯狂的速度散播,感染宿主也不断扩大。

另一方面,禽流感不单单对养禽业造成危害,1997年,第一次禽流感感染人事件后^[18],越来越多的迹象表明,禽流感正通过进化变异逐渐获得直接感染哺乳动物和人的能力,给人类的生命健康带来了巨大的威胁。禽流感因为传播快,范围广,病死率高,已成为一种威胁人类公共健康的主要传染病。

在1997年的5月、9月、12月,香港地区相继有18人感染H5N1病毒,其中6人死亡。感染人的病毒与香港鸡场暴发的高致病性禽流感密切相关。2003年香港H5N1亚型禽流感病毒导致2人感染,1人死亡。

2004年,东南亚再次暴发高致病性禽流感,H5N1亚型禽流感感染对象与以往相比有一个突出特点,即种类繁多^[17]。其中值得特别关注的是H5N1亚型禽流感病毒对哺乳动物(特别是人)的感染性明显增强,泰国甚至还报道了猫、虎、美洲豹等动物的感染个例。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库